

# Una Técnica para diagnóstico de la sanidad de suelos y sustratos agrícolas: Fitopatometría

J. Tello Marquina<sup>(1)</sup>, D. Palmero<sup>(2)</sup>, M. de Cara<sup>(1)</sup>, C. Ruiz Olmos<sup>(1)</sup>, C. Lacasa Martínez<sup>(3)</sup>, A. Moreno<sup>(1)</sup>, O. Montes Zavala<sup>(1)</sup>

(1) Grupo de Investigación AGR 200. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano s/n. 04120. Almería.

(2) Universidad Politécnica de Madrid. EUIT Agrícolas. Madrid.

(3) IMIDA. Dto. de Protección Vegetal. La Alberca. Murcia

## 1.- INTRODUCCIÓN

En un artículo anterior, publicado por Terralia, se puso de manifiesto la complejidad y dificultades de las técnicas clásicas de análisis de suelos para conocer su estado sanitario. En dicho trabajo se presentaba la complejidad que entraña analizar todos los posibles microorganismos fitopatógenos que viven en el suelo: hongos, bacterias, virus, etc. Este trabajo pretende dar a conocer una técnica que simplifica, considerablemente, los trabajos de diagnóstico, integrando, dentro de lo posible, todos los factores que intervienen en la expresión de una enfermedad de origen edáfico (figura 1). Por ejemplo en el potencial infeccioso de un suelo aparecen como factores determinantes los siguientes: densidad de inóculo patógeno en el suelo, capacidad infecciosa del inóculo patógeno y ambiente suelo.

La densidad de inóculo se ha intentado relacionar, durante muchos años, con la gravedad de la enfermedad que ocasiona en el cultivo. La experiencia ha mostrado que en muchas ocasiones la densidad del

inóculo no tiene una relación directa con la expresión de la enfermedad. Un caso extremo, que podría explicar esta situación, son los conocidos **suelos supresivos** a las enfermedades. En dichos suelos aunque el hospedador sensible esté presente y esté, también, el agente patógeno y el ambiente aéreo sea favorable la enfermedad no se expresa. Se contradice así al triángulo de la enfermedad tan conocido en Patología Vegetal (figura 2). Numerosos trabajos de investigación han puesto de manifiesto que las capacidades infecciosas propias de los patógenos y el ambiente suelo intervienen de una manera decisiva en la manifestación de la enfermedad. De estas observaciones nacen las actuales tendencias a utilizar microorganismos antagonistas en el suelo para controlar los patógenos edáficos. El resultado en escala real es más que deficiente. La razón podría estar en que no se conocen los aspectos necesarios del ambiente suelo. Cuando se descubrió que, en los suelos supresivos para las fusariosis vasculares (agente causal *Fusarium oxysporum* y sus formas especializadas), intervenían fenómenos como la competición por el hierro donde las bacterias del género *Pseudomonas* (*Ps. putida*, *Ps. fluorescens*) hacían de intermediarios para que el hierro en suelo rizosférico fuera deficiente, empezó a entenderse la complejidad del ambiente suelo. Se comenzó entonces a meditar sobre las dificultades que existen para que un inóculo antagonista pueda instalarse en un suelo no estéril, llegándose a proponer el concepto de **capacidad de acogida de un suelo** a un microorganismo. Capacidad que difiere para cada suelo.

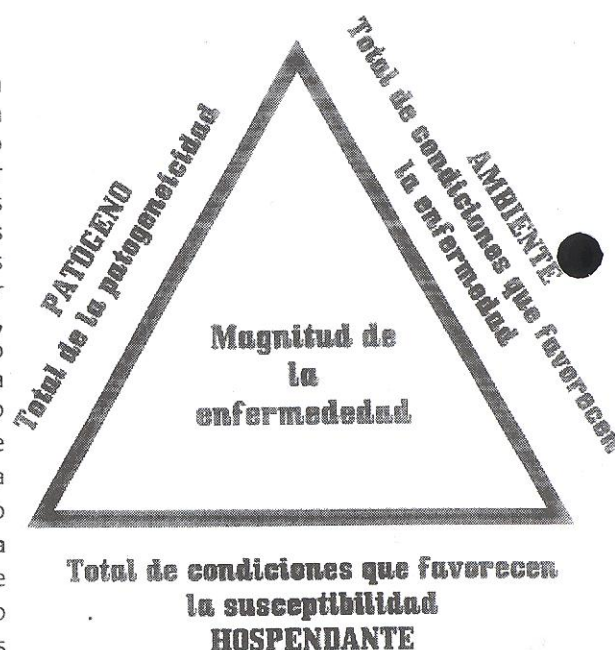


Figura 2: Triángulo de la enfermedad.

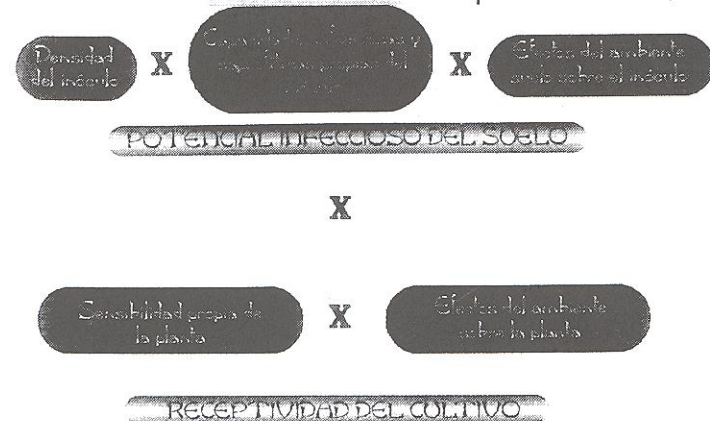


Figura 1: Fórmula de la gravedad de una enfermedad de origen edáfico o telúrico

### ¿Cuáles son las enfermedades de origen edáfico?

Son originadas por hongos (*Aphanomices*, formas especializadas de *Fusarium oxysporum*, otras especies de *Fusarium*, *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum* y un



Este leve recordatorio de aspectos microbiológicos del suelo tiene la intención de aclarar que la densidad de inóculo no siempre tiene una relación directa con la gravedad de la enfermedad. Los métodos tradicionales de análisis fitopatológicos de suelos, están fundamentados exclusivamente en la densidad de inóculo. La fitopatometría pretende estudiar el potencial infeccioso de un suelo aproximándose a su conjunto: ambiente suelo, capacidades infecciosas inherentes al inóculo patógeno y densidad de inóculo de éste.

largo etcétera.), bacteriosis (agentes causales *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* sbsp. *michiganensis*, *Erwinia caratovora*, *Pseudomonas lacrymans*, etc.), nematodos (agentes causales *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Xiphinema*, etc), virosis (agente causal virus de la mancha necrótica del melón, MNSV; virus del mosaico del tomate, ToMV; virus del moteado suave del pimiento, PMMV; etc.). Sólo se han citado unas pocas para dar una idea y ajustándose al espacio consentido para este artículo por la revista. Elegiremos entre ellas dos, una fusariosis causada por *Fusarium oxysporum* y otra incitada por el virus del cribado del melón (MNSV), transmitido por semillas y por el hongo del suelo *Olpidium bornovanus*.

Las micosis producidas por *Fusarium oxysporum* son esencialmente de dos tipos. Unas que afectan el sistema vascular de la planta, conociéndose con el nombre de fusariosis vasculares. Otras que afectan a la raíz y a la base del tallo de la planta nombrándose como fusariosis de la podredumbre del cuello y de la raíz. Entre las primeras se han descrito más de 200 formas especializadas que son más o menos específicas del hospedador. Entre las segundas solo se han descrito 3 formas especializadas. La fitopatometría de suelo permite separar en un solo análisis ambas formas especializadas y sus respectivas razas o patotipos. En este trabajo se presentará la técnica aplicada a las fusariosis de la podredumbre del cuello y de las raíces del tomate causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. No se ha descrito ningún patotipo para este patógeno. La enfermedad fue descrita en España en 1986, posteriormente no se ha publicado trabajo alguno que dé información



Foto 1: Vista de la cámara climatizada.

sobre su gravedad. Posiblemente porque no haya sido realmente importante o se haya confundido con el encharcamiento del cultivo que produce síntomas parecidos pero no iguales. Desde hace 4 años en el Departamento de Producción Vegetal de la Universidad de Almería se está trabajando sobre esta micosis y se ha puesto en evidencia que está extendida en todo el campo de Almería, así como en los cultivos bajo plástico en la costa granadina. Y se ha podido comprobar cómo algún sustrato de los que se utilizan para cultivos sin suelo se ha distribuido en España infectado por el dicho patógeno.

El segundo modelo para la aplicación de la fitopatometría está conformado por el virus de la mancha necrótica del melón (MNSV) y *Olpidium bornovanus* que es un quitridiomyceto del suelo que actúa como vector de este virus. Este modelo tiene sumo interés puesto que para algunos investigadores ha sido el causante del conocido colapso del melón y la sandía. Enfermedad que afecta los melonares y sandiares en todo el mundo. La dificultad del modelo estriba en que tanto el virus como el vector son parásitos obligados, al contrario que *Fusarium oxysporum*, y no pueden ser aislados en medios microbiológicos agarizados. En consecuencia, no se pueden aplicar las técnicas tradicionales de análisis de suelos. Afortunadamente en España, esta enfermedad ha sido controlada con éxito desde hace más de 20 años mediante la utilización

del injerto de ambas cucurbitáceas sobre híbridos de calabaza en los cultivos de sandía, técnica que se está aplicando en los cultivos de melón en el estado de Colima y otros estados de México.

## 2.- DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE FITOPATOMETRÍA DE SUELOS

El diccionario de Ciencias Hortícolas de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas define la fitopatometría de la siguiente manera: Medida y evaluación de las enfermedades de las plantas. Requiere conocimiento de los efectos y daños de las enfermedades y es muy utilizada en la evaluación de los

Foto 2: Recipiente para mezclar vermiculita y suelo o sustrato a estudiar.





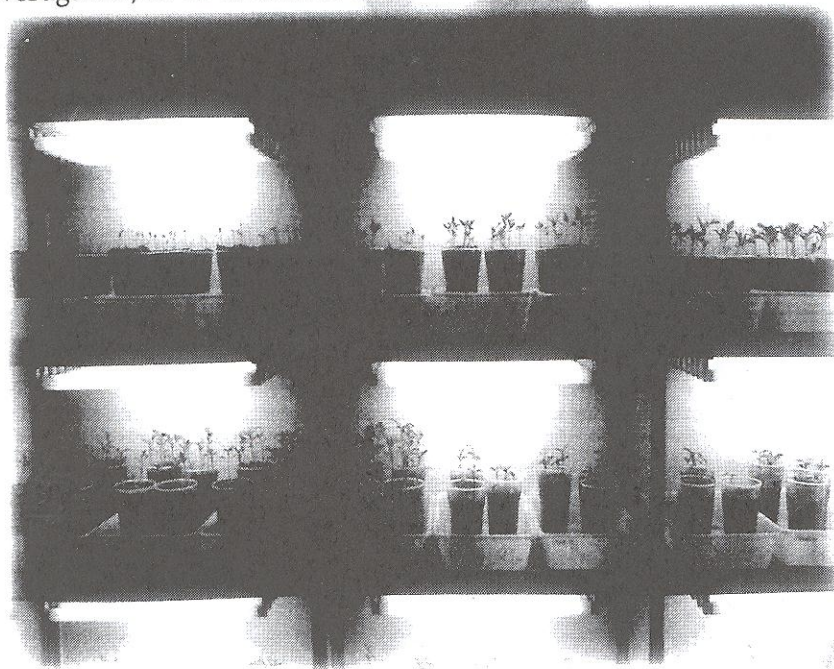
productos químicos y en la resistencia de un hospedador.

Es admisible que en la definición, cuando se contempla la "medida y evaluación de las enfermedades de las plantas", se está considerando todo el ciclo de la enfermedad. Desde el inóculo primario hasta las pérdidas ocasionadas en la producción final. La técnica, tal y como ha sido aplicada en nuestro grupo de investigación, se ha focalizado sobre

enfermedades, se hizo bajo las siguientes condiciones:

El conjunto de suelos, macetas y plantas se mantuvo en una cámara climatizada: fotoperiodo de 16 h·día<sup>-1</sup>, con una luminosidad de 12 - 14 000 lux. Temperaturas que oscilan entre 24°C (fase con luz) y 22 °C (fase oscuridad). Humedad relativa variando de 65 al 85 %

(foto 1)



la detección del inóculo primario en enfermedades de origen edáfico. Sin embargo, este no es el único valor, puesto que ha permitido establecer una predicción sobre el riesgo de enfermedad en el campo, al fin y al cabo una de las metas más importantes en la Protección Vegetal.

La metodología para el desarrollo de la fitopatometría, que se detalla a continuación para dos

El sustrato que se utilizó para "diluir" las muestras de suelo o sustrato hortícola fue vermiculita, desinfectada en autoclave a 120°C durante 1 h.

El mantenimiento de las plantas se hizo fertilizando con abono complejo a razón de 1g·L<sup>-1</sup>. Durante el tiempo que duró el experimento las plantas se abonaron en dos ocasiones (después de la siembra y 8 días después).

#### 2.1.- Detección del inóculo primario de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

La técnica ha sido aplicada a sustratos de uso hortícola (fibra de coco y perlita) y en suelos cultivados con tomate de México y España. No hay diferencias de aplicación ya se trate de suelos o sustratos.

Las concentraciones de suelo o de sustrato ensayadas, oscilan

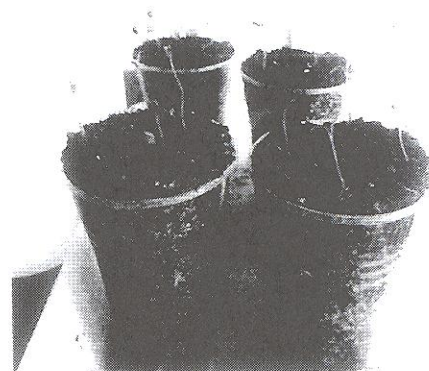


Foto 3: Maceta sembradas con las semillas de tomate sobre la mezcla vermiculita y suelo o sustrato.

desde 0,1g hasta 75g que se añaden a macetas de 1 litro de capacidad de vermiculita estéril. No habiéndose apreciado diferencias significativas en el índice de gravedad de la enfermedad de las plantas de tomate que en ellas se sembraron, cualquiera que haya sido la cantidad utilizada.

La variedad de tomate utilizada ha sido San Pedro, carente de resistencias a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. La elección de variedades es importante, puesto que la técnica permite determinar no solo las formas especializadas, sino, también las razas o patotipos (en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por ejemplo), basta para ello sembrar los cultivares diferenciadores.

La desinfección de semillas para hongos y bacterias, siempre medida necesaria, se hizo con comercial (30 - 40 Cl activo por L) durante 15 - 30 minutos. El aclarado posterior con agua del grifo es necesario para eliminar el cloro, que de otra manera puede interferir negativamente en la germinación.

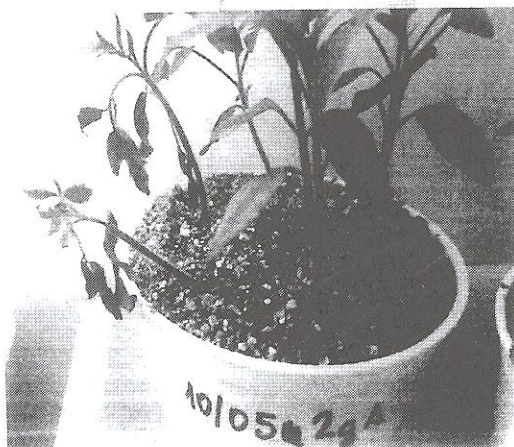
*Es conveniente hacer 3 ó 4 repeticiones por muestra (1 repetición = 1 maceta de 1 L).*

El procedimiento seguido, teniendo en cuenta las observaciones previas fue el que se detalla.

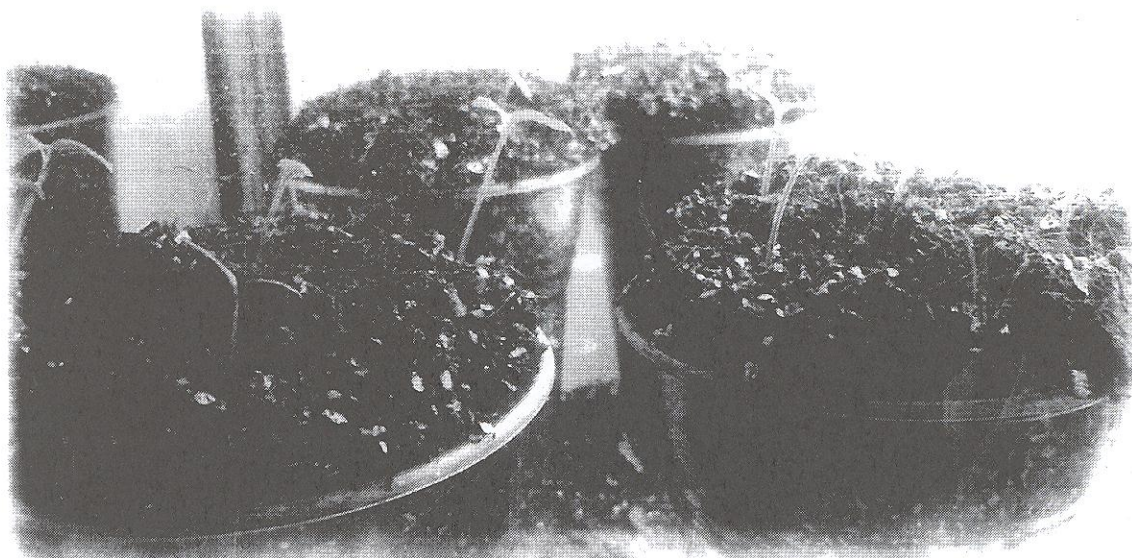
Mezclar la vermiculita (750 ml) con la muestra de suelo o sustrato a estudiar (elegir entre la gama de pesos anteriormente indicada) de manera minuciosa con el fin de que la mezcla resulte la más homogénea posible.

(Foto 2)

Rellenar las macetas desinfectadas (1 L de capacidad) con la mezcla. Alisar y sembrar de 4 a 6







semillas de tomate desinfectadas. Regar con agua hasta saturación.

(Foto 3)

Situar en la cámara climatizada las 4 macetas (repeticiones) por muestra en una bandeja, cuidando que dichas macetas estén elevadas sobre el fondo de la bandeja (media placa de Petri suele ser suficiente) para evitar que los drenajes toquen el fondo de las macetas.

La duración suele variar entre 25 y 60 días, estando en función de la expresión de síntomas. Síntomas que coinciden exactamente con los descritos para las dos fusariosis del tomate.



Foto 4: Expresión de síntomas de *F. o. f. sp. radicum-lycopersici* (foto en maceta y foto con planta arrancada)

(Foto 4)

Opcional es el análisis de plantas para conformar la presencia de *F. oxysporum*, sea en las raíces o cuello podrido o en el xilema necrosado.

(Foto 5)

La desinfección de semillas se hizo con calor seco en estufa a 70 °C durante 6 días. Esta técnica, puesta a punto por la doctora Jordá y su equipo permite desnaturalizar todos los virus, incluido el MNSV, todas las bacterias y todos los hongos. La germinación de las semillas no disminuye.

*Es conveniente hacer 3 ó 4 repeticiones por muestra (1 repetición = 1 maceta de 1 L).*

El procedimiento seguido no difiere significativamente al descrito anteriormente para *Fusarium oxysporum f. sp. radicum-lycopersici*. Sin embargo, algunas diferencias son importantes. En detalle las operaciones son las siguientes:

Mezclar la vermiculita (750 ml) con la muestra de suelo o sustrato a estudiar (elegir entre la gama

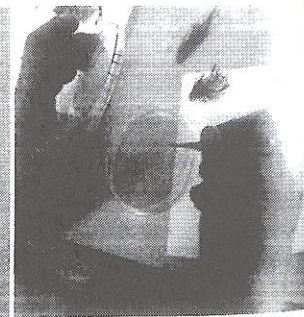
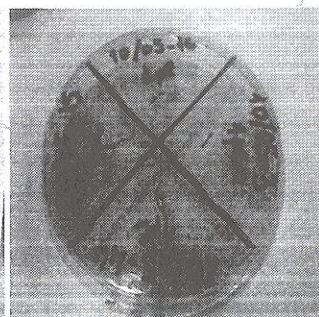
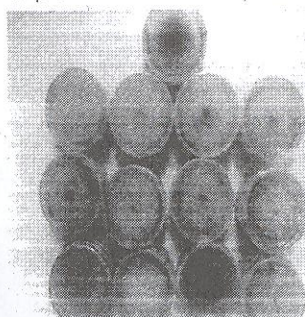
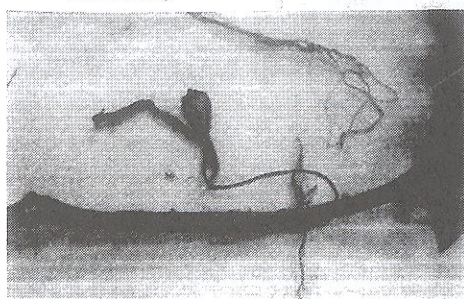
anteriormente indicada) de manera minuciosa con el fin de que el conjunto resulte lo más homogéneo posible.

Rellenar las macetas desinfectadas (1 L de capacidad) con la mezcla. Alisar y sembrar de 4 a 6 semillas de melón o sandía desinfectadas. Regar con agua hasta saturación.

Situar en la cámara climatizada las 4 macetas (repeticiones) por muestra en una bandeja, cuidando que dichas macetas estén elevadas sobre el fondo de la bandeja (media placa de Petri suele ser suficiente) para evitar que los drenajes toquen el fondo de las macetas. Regar.

La duración es de 60 días. En este periodo de tiempo y en las condiciones de la cámara no se expresan síntomas de MNSV. Por lo tanto, al final del experimento hay que arrancar las plantas cuidadosamente y lavar las raíces minuciosamente. Dé cada maceta (4 a 6 plantas) se toman 10 raíces secundarias de aproximadamente 5 cm de longitud.

Foto 5: Análisis de plantas de tomate y colonias de *F. oxysporum*, posterior al periodo de la fitopatometría.





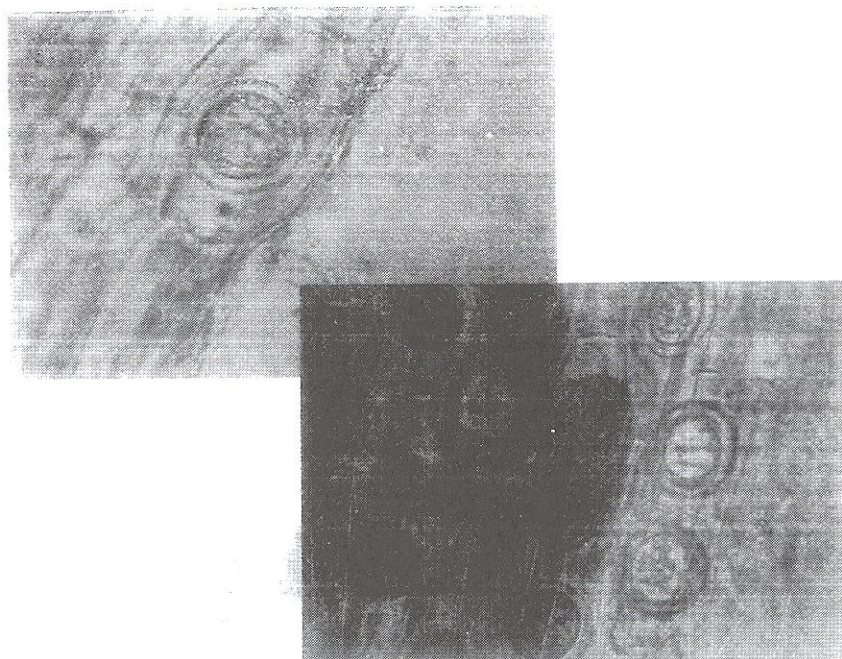


Foto 6: Quistes de *Olpidium bornovanus*.

Se montan en porta y cubre y se observa al microscopio la existencia de "quistes" y esporangios de *Olpidium*. Con objeto de facilitar la lectura de las raíces al microscopio es conveniente hacer un aclarado del tejido con hidróxido potásico al 10%, dejando como mínimo 24 horas que actúe la potasa. Esta conservación se puede prolongar en el frigorífico hasta 3 meses como mínimo, y en congelador hasta un año.

(foto 6)

Para detectar la presencia de MNSV, debe analizarse el cuello de las plantas mediante test de inmuno detección (ELISA) o, para mayor precisión, mediante técnicas biomoleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En este tipo de análisis interfieren con cierta frecuencia hongos del género *Pythium*, por lo cual es conveniente que el riego a la demanda sea muy medido (evitar encharcamiento). La técnica ha sido igualmente útil para detectar patotipos de *F. oxysporum* f. sp. melonis.

(foto 7)



Foto 7: Plantas de melón con síntomas de fusariosis vascular (*F. oxysporum* f. sp. melonis raza 1) en las macetas usadas para la fitopatometría.

